نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۹۸-۳۸۷

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 387-398

مقاله علمی - پژوهشی

تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی

حمیدرضا سیدآبادی[1*]- خدیجه نصیری[2]- زهرا رودباری[3]- سیدعبدالله حسینی[4]- ابوالفضل اکبری[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

متیونین اولین اسید آمینه محدودکننده‌ای است که نقش مهمی در متابولیسم پروتئین و عملکرد سیستم ایمنی در جوجه‌ها دارد. اینترفرون گاما (IFNγ) یکی از اجزا گروه سایتوکاین‌های ایمنی اختصاصی و عامل مهم فعال‌کننده‌ی ماکروفاژها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن IFNγ در جوجه‌های گوشتی سویه آرین می‌باشد. به این منظور در این مطالعه با استفاده از ۴۸۰ قطعه جوجه در دوره رشد (۱۴-۲۸روزگی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ سطح اسید آمینه متیونین (۰/۲۹، ۰/۳۶، ۰/۴۳، ۰/۵۰، ۰/۵۷ و ۰/۶۴)، ۴ تکرار و ۲۰ جوجه در هر تکرار انجام شد. شاخص‌های مورد مطالعه شامل بررسی ایمنی همورال، اندازه‌گیری سلول‌های خونی و میزان بیان ژن IFNγ بود. به منظور بررسی بیان ژن IFNγ ابتدا کل RNA از بافت کبد استخراج و پس از ساخت cDNA، میزان بیان ژن با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژنIFNγ در سطوح مختلف اسید آمینه متیونین اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد ($p≤0/05$)، بطوریکه بیان ژن IFNγ با افزایش سطوح مصرف متیونین، از ۰/۲۹ درصد به ۰/۴۳ به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش ولی تفاوت معنی‌داری بین سطوح متیونین ۰/۵، ۰/۵۷ و ۰/۶۴درصد مشاهده نشد. شاید یکی از دلایل افزایش بیان ژن IFNγ بکارگیری سطوح مناسب متیونین در تیمارهای آزمایشی و بهره‌مندی از مزایای سطوح مناسب متیونین به منظور افزایش عملکرد سیستم ایمنی در پرنده باشد، هرچند که تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بدون چالش عوامل بیماری‌زا انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، جوجه گوشتی، ژن IFNγ، سیستم ایمنی.

مقدمه

بیماری‌های ویروسی و باکتریایی برای صنعت طیور تهدید بزرگی محسوب می‌شوند، بطوریکه پیشگیری و کنترل عوامل بیماری‌زا در جهت جلوگیری از کاهش تولید، امری ضروری می‌باشد. با ادامه تهدید بروز بیماری‌های مختلف و نگرانی در رابطه با استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها در تولیدات حیوانی، یافتن روش‌های جایگزین مناسب، ایمن و عملی، برای جلوگیری یا کنترل پاتوژن‌ها به طور جدی و مبرم مورد نیاز می‌باشد. تعیین شیوه‌های جدید برای طرح ریزی روش‌های درمانی ایمنولوژیکی یا درمان ضد میکروبی برای کاهش پاتوژن های میکروبی در طیور، بیشتر از همیشه مورد نیاز است. درمان ایمنولوژیکی برای کاهش پاتوژن های میکروبی در طیور، هم برای صنعت طیور و هم برای خریداران، دارای ارزش بالایی می‌باشد. فرموله کردن جیره خوراکی براساس اسید آمینه‌ها منجر به تأمین نیاز واقعی طیور می‌گردد و باعث صرفه‌جویی اقتصادی خواهد شد (۲).

متیونین که به عنوان اولین اسید آمینه محدود کننده در خوراک-های تجاری شناخته شده است در تولید آنتی‌بادی نیز مهم است (۱۰). متیونین به عنوان یک پیش‌ماده برای سنتز دیگر اسیدهای آمینه

۱- استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران.
۲- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.
۴- استاد موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران
۵- دانش آموخته دکتری گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران.
(*- ایمیل نویسنده مسئول: hseyedabady@gmail.com)
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.81829

سولفوردار به ویژه سیستئین و چندین متابولیت دیگر عمل می‌کند که شامل گلوتاتیون، کوآنزیم A، تائورین و سولفور غیرآلی می‌باشد (۱۲). در دسترس بودن اسیدهای آمینه بر وضعیت پاسخ ایمنی تأثیر دارد که وابسته به افزایش DNA و سنتز پروتئین در طی تکثیر لنفوسیت‌ها و سنتز آنتی بادی‌ها می‌باشد (۱۲). بنظر می‌رسد در خلال یک پاسخ ایمنی، اجزای جیره خوراکی اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر روی شدت و اثرگذاری پاسخ ایمنی خواهد داشت. برخی موجب افزایش و برخی دیگر موجب کاهش شدت پاسخ ایمنی می‌شوند. لذا هنگام فرمولاسیون جیره‌هایی که برای سیستم ایمنی اپتیمم هستند، توجه به نوع مواد مغذی بالاخص اسیدهای آمینه در این راستا ضروری می‌باشد (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که متیونین اثرات سودمندی روی سیستم ایمنی دارد و پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را بهبود می‌بخشد (۱۰). مکمل‌سازی جیره‌های خوراکی با متیونین معمولاً برای اطمینان از عملکرد مناسب در متابولیسم پروتئین و عملکرد ایمنی ضروری می‌باشد. متیونین مانند سایر اسید آمینه، جزئی از پروتئین‌های بافت است، بنابراین به عنوان پایه‌ای برای سنتز پروتئین عمل می‌کند. علاوه بر این متیونین در متابولیسم گروه متیل شرکت می‌کند که هر دو مسیر ترانس متیلاسیون و ری متیلاسیون را شامل می‌شود (۱۳ و ۱۴). کمبود متیونین می‌تواند منجر به تغییرات پاتولوژیکی و فراساختاری در تیموس، کاهش مقادیر اینترلوکین ۲(IL-2) سرم و جمعیت سلول‌های T و باعث اختلال در عملکرد پرولیفراتیو سلول-های T و افزایش درصد آپوپتوز سلول‌های طحال شود (۲۰). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد متابولیت متیونین، گلوتاتیون، مسیر فاکتور رونویسی هسته κB، عملکرد سلول T کمک کننده و تولید آنتی‌بادی و اینترفرون گاما را در پاسخ به چالش‌های ایمنی تنظیم می‌کند (۹). بنابراین، دخالت متیونین در عملکرد ایمنی احتمالاً مربوط به سنتز آنتی‌بادی‌ها، سایتوکین‌ها و سایر مواد سیتوتوکسیک و همچنین تنظیمات بیان ژن، مسیرهای سیگنال دهی و وضعیت اکسیداتیو احیا سلولی می‌باشد (۹). در جوجه‌ها نیاز متیونین برای مصونیت بهینه بالاتر از نیاز برای رشد یا تبدیل غذایی است. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی برای توضیح تداخل متیونین در سیستم ایمنی بر پایه تکثیر سلولهای ایمنی است که حساس به تغییرات داخل سلولی در سطوح گلوتاتیون و سیستئین می‌باشند؛ ترکیباتی که در متابولیسم متیونین سهیم می‌باشند. محدودیت اسیدهای آمینه سولفوردار منتج به کاهش لنفوئیدی شدید در بافت‌ها روده‌ای و آستر مخاط می‌شود (۱۸). متیونین مورد نیاز در جیره آغازین طیور نباید کمتر از ۰/۵ درصد باشد. با این وجود، توصیه شده است که برای رشد بهینه ۰/۳ درصد متیونین نیاز است. بدون در نظر گرفتن کل اسیدهای آمینه گوگرد دار، سطح متیونین جیره به بیش از۰/۷ درصد برسد عملکرد و رشد طیور کاهش می‌یابد. میزان احتیاجات متیونین برای مراحل آغازین، رشد و پایانی بستگی به سرعت رشد پرنده دارد که این میزان می تواند تحت تأثیر سن جوجه و سطح انرژی جیره نیز قرار گیرد (۱۶).

اینترفرون‌ها (IFNs) پروتئینهای طبیعی هستند که به وسیله سلولهای سیستم ایمنی مهره داران تولید می‌شود و مسئولیت آنها مبارزه با عوامل خارجی از قبیل ویروسها، انگل‌ها و تومورها می‌باشد. اینترفرون‌ها به گروه بزرگی از گلیکوپروتئین‌ها تعلق دارند که سایتوکین نام دارند. اینترفرون‌ها با جلوگیری از رونویسی ویروسی در سلولهای میزبان، فعال کردن سلولهای کشنده طبیعی و ماکروفاژها و افزایش مقاومت سلولها به آلودگی ویروسی به پاسخ ایمنی کمک می-کنند. یکی از انواع اینترفرونها، اینترفرون گاما می‌باشد. اینترفرون گاما تقویت‌کننده سیستم ایمنی بوده و با اثر فعال‌کنندگی فاگوسیت‌ها باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌هایی مانند *استافیلوکوک اورئوس، توکسوپلاسما گوندی، لیشمانیا دونووانی، لیستریا مونوسیتوژنز* و *مایکوباکتریوم اویوم* در داخل سلول‌ها می‌شود (۱۷).

با توجه به اینکه سطح مناسب متیونین جیره باعث افزایش رشد می‌شود و برای ایجاد حداکثر پاسخ ایمنی ضروری است و همچنین متیونین برای افزایش عملکرد سلول‌هایT تولید شده از تیموس مورد نیاز می‌باشد و از طرفی با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثرات سطوح مختلف متیونین جیره بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی سویه آرین در دوره رشد انجام نشده است، مطالعه حاضر اثرات سطوح مختلف متیونین را بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی سویه آرین در دوره رشد مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

گروه‌های آزمایشی، شرایط پرورش و تغذیه

این مطالعه در سالن مرغداری مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در کرج انجام گرفت. قبل از ورود جوجه‌ها آماده‌سازی سالن و مراحل شستشو، ضد عفونی و گازدهی انجام گرفت. در این مطالعه از ۴۸۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه تجاری آرین استفاده شد. جوجه‌ها به ۶ گروه آزمایشی مشتمل بر ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ قطعه جوجه گروه‌بندی شدند. شرایط دما، نور و ترکیب جیره برای تمامی جوجه‌ها یکسان بود و جوجه‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در زمان شروع پرورش، جیره‌ی آغازین (۱-۱۴ روزگی) به صورت یکسان در اختیار تمامی جوجه‌ها قرار گرفت، اما میزان متیونین خوراک در دوره رشد (۱۵-۲۸ روزگی) در تکرارهای مختلف متفاوت بود. جیره‌های آزمایشی (جدول۱)، براساس ترکیبات اندازه-گیری شده در آزمایشگاه و با احتساب مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ارائه شده در جدول (NRC 1994) با استفاده از برنامه UFFDA تنظیم شد (جدول ۲). اختلاف در سطوح متیونین جیره در دوره رشد شامل ۰/۲۹، ۰/۳۶، ۰/۴۳، ۰/۵۰، ۰/۵۷ و ۰/۶۴ درصد بود.

جدول ۱– مواد خوراکی مورد استفاده در جیره گروه‌های آزمایشی در دوره رشد

Table1- Feed ingredients used in the diet of the experimental groups in the growth period

مواد خوراکی Ingredients	سطح متیونین (۰/۲۹) Met Level 0.29(%)	سطح متیونین (۰/۳۶) Met Level 0.36(%)	سطح متیونین (۰/۴۳) Met Level 0.43(%)	سطح متیونین (۰/۵) Met Level 0.50(%)	سطح متیونین (۰/۵۷) Met Level 0.57(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)
ذرت Corn	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97
کنجاله سویا Soybean meal	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
نشاسته ذرت Corn starch	5.54	5.87	6.2	6.53	6.86	7.2
روغن سویا Soybean oil	1.79	1.75	1.72	1.68	1.64	1.61
گندم Wheat	15	14.63	14.26	13.89	13.52	13.16
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63
صدف Calcium carbonate ($CaCO_3$)	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
نمک NaCl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
جوش شیرین Sodium bicarbonate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
دی ال – متیونین DL-Methionin	-	0.07	0.14	0.21	0.28	0.36
ال– لیزین L-Lysine	-	-	-	-	0.01	0.01
مکمل معدنی[۱] Mineral supplements[1]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
مکمل ویتامینی[۲] Vitamin supplements[2]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	100	100	100	100	100	100

[۱] مکمل مواد معدنی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تأمین می‌نمود. منگنز (اکسید منگنز) ۱۰۰ میلی‌گرم. آهن (سولفات آهن H2O ۷) ۵۰ میلی‌گرم، روی (اکسید روی) ۱۰۰ میلی‌گرم، مس (سولفات مس 5H2O) ۱۰ میلی‌گرم، ید (یدات کلسیم) ۱ میلی‌گرم، سلنیوم (سدیم سلنیت) ۰/۲ میلی‌گرم.

[۲] مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تأمین می‌نمود. ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین المللی. ویتامین B_1، ۱/۸ میلی‌گرم. ویتامین B_2، ۶/۶ میلی‌گرم. نیاسین، ۳۰ میلی‌گرم. کلسیم پانتوتنات، ۱۰ میلی‌گرم. ویتامین B_6، ۳ میلی‌گرم. فولیک اسید ۱ میلی‌گرم. ویتامین B_{12}، ۰/۰۱۵ میلیگرم. بیوتین ۰/۱ میلی‌گرم. ویتامین D_3، ۲۰۰۰ واحد بین المللی. ویتامین E، ۱۸ واحد بین المللی. ویتامین K_3، ۲ میلی گرم. کولین کلراید ۵۰۰ میلی گرم.

[1]The mineral premix supplied per kilogram of diet: Manganese (manganese oxide) 100 milligrams. Iron (iron sulfate H2O7) 50 mg, zinc (zinc oxide) 100 mg, copper (copper sulfate H2O5) 10 mg, iodine (calcium iodine) 1 mg, selenium (sodium selenite) milligrams.

[2]The vitamin premix supplied per kilogram of diet: vitamin A as acetate, 9000 IU; Vitamin 1B, 1.8 milligrams. Vitamin B_2, 6.6 mg. Niacin, 30 milligrams. Calcium pantothenate, 10 milligrams. Vitamin B_6, 3 milligrams. Folic acid 1 milligram. Vitamin B_{12}, 0.015 mg. Biotin 0.1 mg. Vitamin D_3, 2000 IU. Vitamin E, 18 IU. Vitamin K_3, 2 mg. Choline Chloride 500 mg.

جدول۲– آنالیز مواد مغذی جیره گروه‌های آزمایشی
Table 2- Nutrient analysis of diet in the experimental groups

سطوح متیونین Met levels	متیونین (Met) 0.29(%)	متیونین (Met) 0.36(%)	متیونین (Met) 0.43(%)	متیونین (Met) 0.5(%)	متیونین (Met) 0.57(%)	متیونین (Met) 0.64(%)
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم) Metabolisable energy, Kcal/kg	2900	2900	2900	2900	2900	2900
پروتئین خام (درصد) Crude protein(%)	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
کلسیم(درصد) Calcium(%)	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
فسفر قابل دسترس(درصد) Available Phosphorus (%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
سدیم (درصد) Sodium (%)	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167
متیونین + سیستین(درصد) Methionine+cysteine(%)	0.65	0.72	0.79	0.86	0.93	1
لیزین (درصد) Lysine(%)	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16
آرژنین (درصد) Arginine (%)	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41
ایزو لوسین (درصد) Iso Loucine (%)	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
لوسین (درصد) Leucine(%)	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72
ترئونین (درصد) Threonine(%)	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
تریپتوفان (درصد) Tryptophan (%)	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27

جیره‌ها از لحاظ میزان انرژی قابل سوخت و ساز، نیتروژن، تعادل الکترولیت ها (Na+K-CL) و سایر مواد مغذی یکسان بودند به طوری که تنها عامل متغیر میزان متیونین موجود در جیره‌ها بود. جیره‌های آزمایشی از لحاظ سایر آمینواسیدها ضروری براساس نسبت ایده آل آمینواسید به آمینواسید مرجع (لیزین) که توسط فیشر در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد شده است تنظیم شد. همچنین مقدار سیستین جیره‌ها بالاتر از سطح نیاز تأمین شد تا از تبدیل متیونین به سیستین جلوگیری شود.

تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند

به منظور ارزیابی سیستم ایمنی در روزهای ۲۱ و ۳۵ از دوره پرورش به سه قطعه از هر گروه آزمایشی از طریق عضله سینه مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند (۰/۵ درصد) تهیه شده در بافر فسفات استریل تزریق شد و یک هفته بعد از هر تزریق از همان جوجه‌های گوشتی یک میلی‌لیتر خون از ورید بال گرفته شد. سرم خون با قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. نمونه‌های سرم خون جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند و در ادامه برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند (IgG+IgM) از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر توسط روش آزمایشگاهی که توسط محققین (۱۹) شرح داده شده است، انجام شد.

شمارش گلبول‌های قرمز خون

جهت شمارش گلبول‌های قرمز از روش دستی با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار و میکروسکوپ نوری استفاده شد و نتیجه برحسب تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌مترمکعب خون محاسبه گردید. جهت رقیق نمودن خون از محلول رقیق کننده نات[1] و هریک[2] استفاده شد.

1 - Natt
2 - Herrik

مواد مورد استفاده جهت ساخت محلول فوق عبارتند از: $NaCl$ (۳/۸۸ گـرم)، Na_2SO_4 (۲/۵ گـرم)، $Na_2HPO_4\ 12H_2O$ (۲/۹۱ گـرم)، KH_2PO_4 (۰/۲۵ گرم)، فرمالین ۳۷ درصد (۷/۵ میلی لیتر) و متیل و لوله (۰/۱ گرم) که در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شـده و پـس از صاف کردن با کاغذ صافی تا ۲۴ ساعت قابل استفاده است.

شمارش تفریقی گلبول های سفید

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید به طریق تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا و شمارش زیر میکروسکوپ انجـام شـد. بـه ایـن ترتیب که قطره خون در یک سانتیمتری انتهای لام هموسایتومر قرار داده شد. لبه لام دیگر بر روی قطره خون قرار گرفت. بعد از خشـک شدن گسترہ خونی، خون خشک شده روی لام توسط متـانول ثابـت شد. بعد از خشک کردن مجدد، لام هموسایتومر بـرای رنـگ‌آمیـزی آماده شد. رنگ گیمسا به نسبت ۱:۱۰ رقیق (۱ میکرولیتر رنـگ + ۹ میکرولیتر آب) شد و سپس لام هموسایتومر داخـل آن قـرار گرفـت. شمارش گلبول‌های سفید (هتروفیل و لنفوسـیت) زیـر میکروسـکوب نوری و به روش شمارش با چشم انجام شد (۶).

تعیین درصد حجمی گلبول قرمز (هماتوکریت)

در این آزمایش در ۲۸ روزگی از هر تکرار دو قطعه جوجه به طور تصادفی انتخاب کرده و با استفاده از لوله های موئینه‌ای که در داخل این لوله‌ها آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین بود از پرنده‌ها خون گرفته شد. تعیین میزان هماتوکریت نیز توسط روش آزمایشگاهی که توسط محققین (۱۵) شرح داده شده است، انجام شد.

بیان ژن IFNγ

به منظور بررسی بیان نسبی ژن IFNγ در سن ۲۸ روزگـی دوره پرورش تعداد ۴ قطعه پرنده از هر تیمار آزمایشی انتخاب شده و بعد از کشتار، نمونه‌هایی از بافت کبد جدا و نمونه‌های جمع‌آوری شده پـس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در ادامه، استخراج RNA کـل از بافـت کبـد طبـق دسـتورالعمل کیـت اسـتخراج SV Total RNA Isolation System (پرومگـا، آمریکـا) صورت گرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و نانودراپ صورت گرفت. در ادامـه، RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI عاری از RNase از هرگونه آلـودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA پاکسازی شد. برای سنتز cDNA از کیـت سـنتز cDNA شـرکت ترمـو فیشـر (آمریکـا) (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. از هر نمونه ۲ میکروگرم از RNA کل جهت سـنتز cDNA استفاده شد. طراحی آغازگرها بـه منظـور بررسـی بیـان ژن IFNγ در جوجه‌های گوشتی با استفاده از نرم‌افـزار Primer premier نسخه ۵ (پرایمر بایوسـافت، آمریکـا) انجـام شـد و توسـط شـرکت سیناکلون (ایران) ساخته شد. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن IFNγ در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول۳- توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای بیان ژنهای GAPDH و IFNγ

Table 3- Sequence of specific primers used for GAPDH and IFNγ gene expression

ژن Gene	توالی‌های آغازگر Primer sequences	شماره دسترسی Accession Number	دمای اتصال Annealing Temperature	طول محصول Product length
IFNγ	F 5´-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3´ R 5´-GGCTTTGCGCTGGATTC-3´	NM_205149.1	۶۰°C	۲۵۹ جفت باز 259 bp
GAPDH	F 5´- GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3´ R 5´- ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3´	NM_204305.1	۶۰°C	۲۶۴ جفت باز 264bp

جهـت انجـام واکـنش Real Time PCR از کیـت SYBER Green qPCR Master Mixes ساخت شرکت ترمو فیشر (آمریکـا) استفاده شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتـر شـامل ۱۲/۵ میکرولیتـر Master Mix (Maxima® SYBER Green'ROX qPCR (2X) ، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکو مول)، ۱ میکرولیتر cDNA الگو و ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. هر واکنش به صورت ۳ تکرار صورت گرفـت. بـه منظـور تهیـه نمونه کنترل منفی برای انجام واکنش Real Time PCR به تیـوپ دیگر، به جای cDNA آب دوبار تقطیر اضافه گردید و در ادامه نمونه‌ها در دستگاه Lightcyclear96 (رش، آلمان) با برنامه حرارتـی زیـر جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن IFNγ قرار داده شدند.

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـرای ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ برای ۳۰ ثانیـه و گسـترش در ۷۲ درجـه سانتی‌گراد ۳۰ برای ثانیه انجام شد. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها رسم شد. در پژوهش حاضر، تغییـرات نسـبی بیـان ژن IFNγ نسبت به ژن GAPDH (ژن مرجع) نرمال شد. در ادامه بیان نسـبی ژن IFNγ نسـبت بـه GAPDH بـه روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسـبه شـد

(۱۱). در روش فوق فرض بر این است که بازدهی ژن‌های مورد نظر نزدیک به ۱۰۰درصد است و برای ایـن منظـور از منحنـی اسـتاندارد استفاده می‌شود. در این روش رقت‌های مختلفی از *cDNA* تهیـه و برای آن‌ها Real time PCR گذاشته می‌شود.

تحلیل آماری داده‌ها

کل اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم‌افـزار آمـاری SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز گردید (SAS Institute 2003). برای مقایسه میانگین‌ها گروه‌های آزمایشی از آزمـون تعقیبـی تـوکی و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج و بحث

یافته‌های مربوط به شاخص فراسنجه‌های ایمنـی هومـورال در جدول ۴ ارائه شـده اسـت. طبـق یافتـه‌هـا پاسـخ بـه گلبـول قرمـز گوسفندی، ایمنوگلبولین G و ایمنوگلبـولین M تحـت تـأثیر سـطوح مختلف متیونین قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به ایمنی سلولی در جدول ۵ درج شده اسـت. طبـق نتایج، گلبول‌های سفید خون، هتروفیل، لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تحت تأثیر سطوح مختلف متیونین قرار نگرفـت (p>۰/۰۵). اما تعداد گلبول‌های قرمز تحت تأثیر سـطوح مختلـف متیـونین قـرار گرفت (p<۰/۰۵) به طوریکه بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز مربـوط به سطح متیونین ۰/۲۹ و کمترین آن مربوط به ۰/۵۷ بود.

با توجه به اینکه تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بـدون چالش‌های بیماری‌زا و غیـره انجـام شـد، بنـابراین سـطوح مختلـف متیونین جیره تأثیری در فراسنجه‌های ایمنی نداشتند.

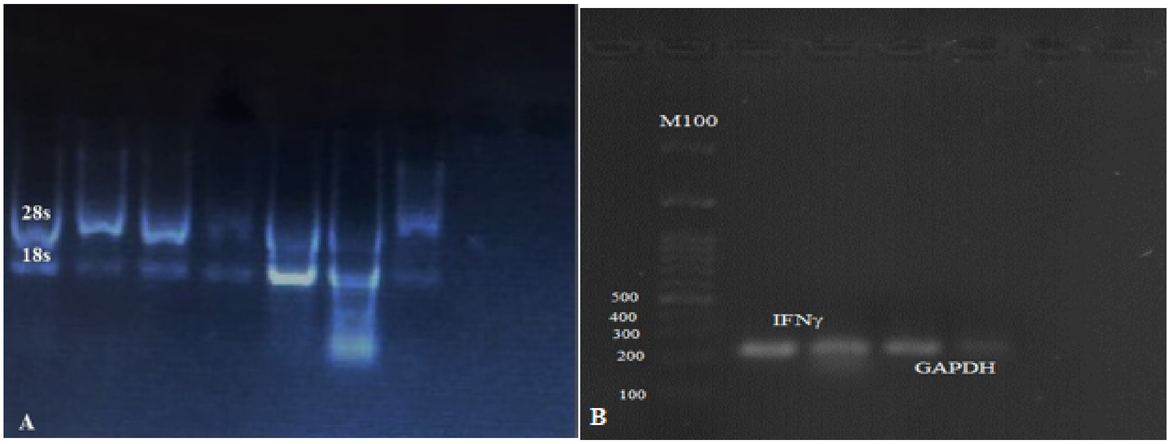
نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های RNA اسـتخراج شـده در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ در محدوه ۱/۹–۱/۸ بود و حضور بانـدهای ۱۸s و ۲۸s در شکل 1A کـه نشـان‌دهنـده کیفیـت مطلـوب RNA اسـتخراج شـده بـود. نتـایج منحنـی تکثیـر Real Time PCR و محصـولات PCR روی ژل آگـارز نشـان دادنـد کـه ژن IFNγ و GAPDH در بافت کبد تکثیر شده است. صحت تکثیر قطعات ژنـی IFNγ و GAPDH در شکل 1B نشان داده شـده اسـت. مشـاهده تک باند در محدوده‌ی ۲۵۹ جفت باز برای ژن IFNγ و در محدوده‌ی ۲۶۴ جفت باز برای ژن GAPDH در مورد همـه نمونـه‌هـا، بیـانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر می‌باشد.

جدول۴– اثر سطوح مختلف متیونین جیره بر شاخص فراسنجه‌های ایمنی هومورال
Table 4- Effect of different levels of dietary methionine on humoral immune parameters

ایمنوگلوبولین M IgM	ایمنوگلوبولین G IgG	پاسخ به SRBC Response to SRBC	سطوح متیونین Methionine levels (%)
3.1	1.9	5	0.29
2.6	1.9	4.5	0.36
3.2	1.9	5.1	0.43
2.8	1.2	4.9	0.50
2.6	1.7	3.4	0.57
2.3	2.2	4.5	0.64
0.145	0.133	0.179	SE
0.684	0.973	0.847	معنی داری Significant

جدول۵– اثرات سطوح متیونین بر هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و اجزاء آن
Table 5- Effects of methionine levels on hematocrit, number of red and white blood cells and its components

نسبت هتروفیل به لنفوسیت Heterophile ratio to lymphocyte	لنفوسیت Lymphocyte	هتروفیل Heterophile	گلبول‌های قرمزخون Red Blood Cells	گلبول‌های سفید خون White Blood cells	سطح متیونین Methionine level (%)
-	درصد(٪)	درصد(٪)	10^6 × تعداد در میکرولیتر	10^6 × تعداد در میکرولیتر	
0.399	70	27.8	2.962	36060	0.29
0.386	69.8	26.8	2.580	36980	0.36
0.410	69	28	2.460	30740	0.43
0.415	68.6	28.4	2.380	33000	0.5
0.394	70.2	28.4	2.194	41140	0.57
0.431	68.2	29.2	2.368	33020	0.64
0.01	0.56	0.55	0.059	10.32	SE
0.41	0.61	0.43	0.0104	0.0938	معنی داری Significant

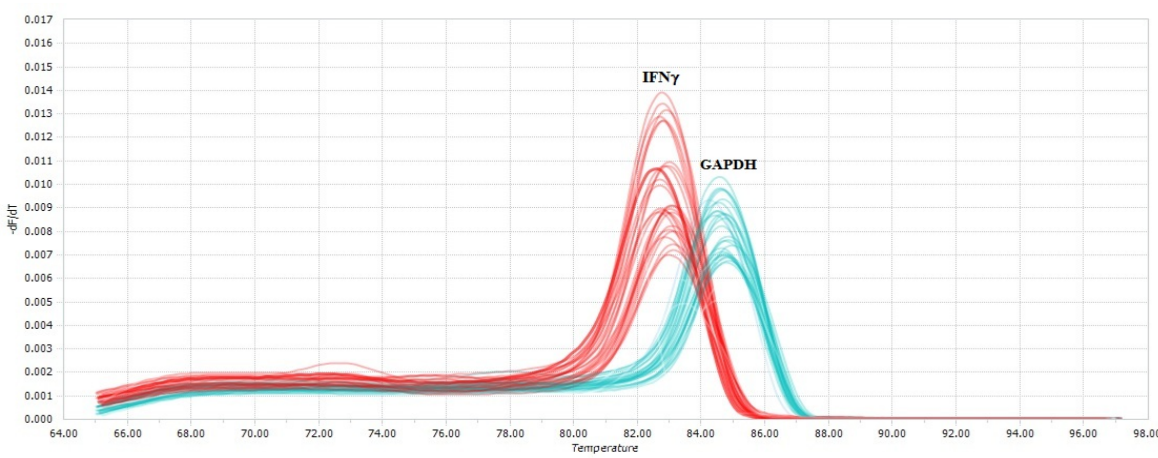


شکل۱– A کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های کبد جوجه گوشتی روی ژل آگارز. B الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ و GAPDH روی ژل آگارز

Figure 1- (A) Quality of RNA extracted from liver tissues on agarose gel. (B) Electrophoresis of PCR products using IFNγ and GAPDH specific primers on agarose gel

در طی انجام واکنش Real-time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل به صورت منحنی تکثیر نشان داده می‌شود. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان‌دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.

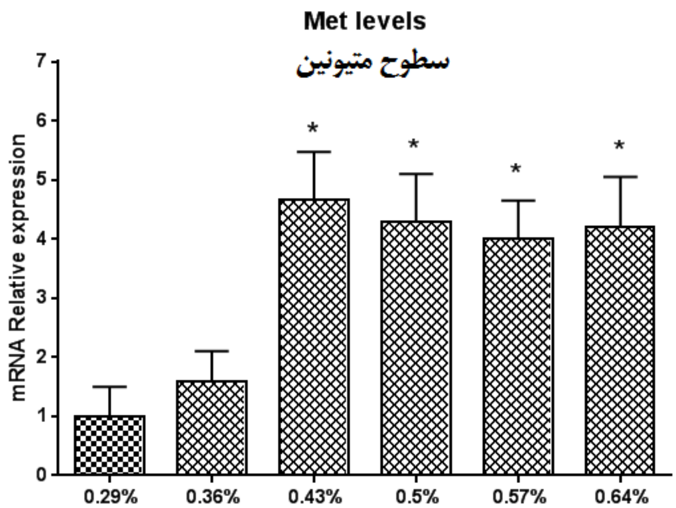
منحنی ذوب(دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است) ژن‌های IFNγ و GAPDH که در شکل ۲ نشان داده شده است اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR را نشان می‌دهد.



شکل۲– منحنی ذوب محصول ژن IFNγ و GAPDH حاصل از واکنش Real Time PCR برای جوجه‌های گوشتی

Figure 2- Melting curve of IFNγ and GAPDH amplification using Real Time PCR for broiler chickens

با توجه به اینکه در این آزمایش سطوح مختلف متیونین مورد بررسی قرار گرفت و برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا پایین‌ترین سطح مصرف روزانه متیونین (۰/۲۹ درصد) به عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیان ژن IFNγ با افزایش سطوح مصرف متیونین، از ۰/۲۹ درصد به ۰/۴۳ به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود (p≤۰/۰۵). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح متیونین ۰/۵، ۰/۵۷ و ۰/۶۴ درصد مشاهده نشد.



شکل۳- تغییرات چند برابری ژن IFNγ در سطوح مختلف متیونین جیره در مقایسه با سطح متیونین ۰/۲۹ (گروه کنترل)

Figure 3-The fold change of IFNγ gene in different levels of diet methionine in comparison with Met level 0.29% (Control group)

در مطالعه‌ای نشان داده شد که دما و بالانس اسیدهای آمینه هر دو روی نیازهای اسیدهای آمینه جوجه‌های گوشتی تأثیر می‌گذارند. این آزمایش در سن ۷ تا ۲۱ روزگی انجام شد و جوجه‌ها با جیره‌های ذرت-سویا حاوی ۱/۵۲درصد آرژنین تغذیه شده بودند، نیازهای متیونین جوجه‌های گوشتی راس به ترتیب بر طبق افزایش وزن بدن و اطلاعات ضریب تبدیل غذایی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۰۲ ± ۰/۴۳ درصد و ۰/۰۳ ± ۰/۴۳ بود، در حالیکه نیاز متیونین همین جوجه‌ها به ترتیب بر طبق افزایش وزن بدن و اطلاعات ضریب تبدیل غذایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۰۱ ± ۰/۴۳ و ۰/۰۳ ± ۰/۴۸ درصد بود (۴).

در مطالعه‌ای دیگر بیان mRNA ژن IFNγ در جوجه های مبتلا به عفونت سالمونلا با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد و نتایج نشان داد که با توجه به اینکه ژن‌های سایتوکاین دارای نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی طیور دارند اما بیان ژن IFNγ تغییری در آن مشاهده نشد (۷). نشان داده شد که نیاز متیونین برای پاسخ ایمنی سلولی بیشتر از مقداری است که برای رشد بهینه لازم است، و جیره‌های همراه با متیونین ۰/۴۵، ۰/۶۰، ۰/۷۵ و ۰/۹ درصد به طور معنی‌داری پاسخ ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی را در مقایسه با جیره‌های پایه و تجاری بهبود بخشیدند (۱۷). مطالعه‌ای به منظور بررسی بیان ژن‌های سایتوکاین در جوجه‌های گوشتی و اردک‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای مرغی انجام شد و نشان داده شد که بیان ژن IFNγ در کبد جوجه‌های گوشتی بالاتر از بیان آن در کبد اردک بود؛ در حالیکه بیان ژن IFNα در هر دو گونه یکسان بود (۱).

اثر اسیدآمینه‌های لیزین، آرژنتین، ترئونین یا متیونین+ سیستئین بر پروفایل بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH، IGF-I، IGF-II و mucin) و مرتبط با ایمنی (IL-2، IL-4، IL-6، IL-12، TNF-α و *IFN-γ*) در جنین ۱۴ روزه جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان دادند که آرژنین و ترئونین باعث افزایش بیان ژن-های مرتبط با رشد می‌شوند، در حالی که ترئونین و Met + Cys موجب بیان ژن های ایمنی در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (۳).

همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر ترکیب متیونین (پیشنهادی NRCو دو برابر پیشنهادی NRC) و روغن ماهی (۰، ۲/۵ و ۵/۵ درصد) روی ایمنی سلولی در جوجه‌های گوشتی در معرض چالش با بیمای بورس عفونی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج پس از ۷ روز چالش نشان دادند که جوجه‌های تغذیه شده با ۵/۵ درصد روغن ماهی پروتئین کل بالاتر، تعداد گلبول‌های سفید بالاتر و غلظت IL-2 بالاتری دارند. استفاده از روغن ماهی روی غلظت *IFN-γ* تأثیری نداشت؛ در حالیکه مکمل سازی جیره با سطح متیونین دو برابر پیشنهادی NRC منجر به افزایش غلظت سرمی *IFN-γ* و گلوبولین شده بود و پیشنهاد شد که سطح متیونین دو برابر پیشنهادی NRC و ۲/۵ درصد روغن ماهی ممکن است پاسخ ایمنی زا را در جوجه‌های گوشتی در معرض چالش با عفونت بورس افزایش دهد (۱۲).

نشان داده شد که افزایش سطوح متیونین جیره از سطح ۰/۴۵ درصد به ۰/۵۶ و ۰/۶۸ درصد منجر به افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده یا تحت درمان علیه کوکسیدیا شده است. در مقابل سطوح بالای متیونین در جیره منجر به بهبود عملکرد رشد در حیوانات واکسینه شده نشد. سطوح بالای متیونین (۰/۵۶ درصد و ۰/۶۸ درصد) در جیره به جوجه‌های

واکسینه شده یا تحت درمان کمک کرد تا در مقابل عفونت *Eimeria tenella* مقاوم بمانند که نشان دهنده بهبود مورفولوژی روده و عملکرد سیستم ایمنی بود. همچنین با افزایش سطح متیونین جیره از ۰/۵۶درصد به ۰/۶۸ درصد سطوح بیان TNF-α و IL-2 را در جوجه‌های تحت درمان افزایش یافته بود، درحالیکه سطوح بیان TNF-α و IL-2 در جوجه‌های واکسینه شده تحت تأثیر متیونین جیره قرار نگرفته بود. بیان ژن IFNγ نیز در جوجه‌های گوشتی تحت درمان افزایش یافته بود اما در جوجه‌های واکسینه شده کاهش یافته بود. سطح متیونین ۰/۴۵ درصد در جیره بالاترین بیان ژن IFNγ را در بین همه تیمارهای آزمایشی منجر شد (۸).

در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که مکمل‌سازی جیره با متیونین آزاد یا متیونین دی پپتید باعث کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش بیان ژن های IFNγ وCAT-1 و سرکوب ژن های OCLN، IL2، TLR5، PEPT1 وB0 AT1 در جوجه‌های گوشتی مبتلا به عفونت Eimeria spp می‌شود (۵).

یافته‌های این پژوهش در زمینه بررسی اثرات سطوح تغذیه‌ای متیونین درجوجه‌های گوشتی آرین، با برخی تحقیقات مشابه صورت گرفته مطابقت (۶ و ۸) دارد. با توجه به اینکه ژن IFNγ یک نوع سایتوکاین می‌باشد و سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های سیستم ایمنی مهره‌داران تولید می‌شوند و به طور کلی سایتوکاین‌ها به صورت مولکول‌های از پیش ساخته وجود ندارند و تولیدشان با آغاز نسخه برداری از ژن‌ها انجام می‌گیرد. این فعالیت نسخه برداری معمولاً موقتی بوده و mRNA کد کننده سایتوکاین ها ناپایدارند و در صورتی که سیستم ایمنی تحت تأثیر پاتوژن تحریک شود ایمنی ذاتی اولین راه دفاعی میزبان می‌باشد که بعد از تشخیص حمله پاتوژن‌ها، گیرنده‌های سلولی میزبان مانند Toll-like و الیگومرهای نوکلئوتیدی که گیرنده‌ها را در بر می‌گیرند، قادرند سیگنال‌هایی را انتقال دهند و متعاقب آن شبکه‌های بیان ژن‌های سایتوکاین شروع به فعالیت می‌کنند تا در نهایت پاسخ های ایمنی ذاتی آغاز گردند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که بیان ژن IFNγ با افزایش سطوح مصرف متیونین از ۰/۲۹ درصد به بالا به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. شاید یکی از دلایل افزایش بیان ژن IFNγ در این تحقیق بکارگیری سطوح مناسب متیونین در تیمارهای آزمایشی و بهره‌مندی از مزایای سطوح مناسب متیونین در جیره به منظور افزایش عملکرد سیستم ایمنی در پرنده باشد، هرچند که تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بدون چالش عوامل بیماری‌زا انجام شده بود.

منابع

1- Adams, S.C., Z. Xing, J. Li, and C. J. Cardona. 2009. Immune-related gene expression in response to H11N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. Molecular immunology, 46:1744-1749.

2- Bateman, A., D. A. Roland and M. Bryant .2008. Optimal methionine + cysteine / lysine ratio for first cycle of egg production in commercial leghorns. International Journal of Poultry Science, 7: 932-939.

3- Bhanja, S. K., M. Sudhagar, A. Goel, N. Pandey, M. Mehra, S. K. Agarwal, and A. Mandal. 2014. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by in ovo supplementation of amino acids in broiler chickens. Czech Journal of Animal Science, 59:399-408.

4- Chamruspollert, M., G. M. Pesti, and R. I. Bakalli. 2004. Influence of Temperature on the Arginine and Methionine Requirements of Young Broiler Chicks. The Journal of Applied Poultry Research, 13:628-638.

5- De Souza Khatlab, A., A. P. Del Vesco, A. R. de Oliveira Neto, R. P. Fernandes, and E. Gasparino. 2019. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide mitigates intestinal oxidative stress induced by Eimeria spp. challenge in broiler chickens. Journal of Animal Science and Biotechnology, 10(1):58.

6- Grass, W. B., and H. S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophile/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian Disease, 27:972-979.

7- Kogut, M. H., L. Rothwell, and P. Kaiser. 2005. IFN-γ priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of Salmonella enterica serovar enteritidis. Journal of Interferon & Cytokine Research, 25:73-81.

8- Lai, A., G. Dong, D. Song, T. Yang, and X. Zhang. 2018. Responses to dietary levels of methionine in broilers medicated or vaccinated against coccidia under Eimeria tenella-challenged condition. BMC Veterinary Research, 14:140.

9- Li, P., Y. L. Yin, D. Li, S. W. Kim, and G. Wu. 2007. Amino acids and immune function. British Journal of Nutrition, 98: 237-252.

10- Liu, Z., A. Bateman, M. Bryant, A. Abebe, and D. Roland. 2004. Estimation of bioavailability of DL-methionine hydroxy analogue relative to DL-methionine in layers with exponential and slope-ratio model. Poultry Science, 83:1580-1586.

11- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25: 402-408.

12- Maroufyan, E., A. Kasim, G. Yong Meng, M. Ebrahimi, L. Teck Chwen, P. Mehrbod, B. Kamalidehghan, and A. Soleimani Farjam. 2013. Effect of dietary combination of methionine and fish oil on cellular immunity and plasma fatty acids in infectious bursal disease challenged chickens. The Scientific World Journal, 2013(1):531397.

13- Métayer, S., I. Seiliez, A. Collin, S. Duchêne, Y. Mercier, P. A. Geraert, and S. Tesseraud. 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. The Journal of nutritional biochemistry, 19:207-215.

14- Mirzaaghatabar, F., A. A. Saki, P. Zamani, H. Aliarabi, and H. R. Hemati Matin. 2011. Effect of different levels of diet methionine and metabolisable energy on broiler performance and immune system. Food and Agricultural Immunology, 22:93-103.

15- Nafisi Bahabadi, M., S. Dadgar, F. Lakzaei, Z. Mohajeri, and R. Abdolahi. 2016. The effect of subacute concentrations of Butachlor herbicide on some blood parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Iranian Scientific Fisheries Journal, 25:151-160. (In Persian)

16- Ohta, Y., and T. Ishibashi. 1995. Effect of dietary glycine on reduced performance by deficient and excessive methionine in broilers. Japanese Poultry Science, 32:81-89.

17- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferonγ: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of leukocyte biology, 75:163-189.

18- Shini, S., X. Li, and W. L. Bryden. 2005. Methionine requirement and cell-mediated immunity in chicks. Asia Pacific journal of clinical nutrition, 14: 123.

19- Wegmann, T., and O. Smithies. 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion, 6: 67-75.

20- Wu, B.Y., H. M. Cui, P. Xi, J. Fang, W. Cui, and X. D. Liu. 2012. Effect of methionine deficiency on the thymus and the subsets and proliferation of peripheral blood T-cell, and serum IL-2 contents in broilers. Journal of Integrative Agriculture, 11:1009-1019.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 387-398

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۹۸-۳۸۷

Effect of Different Levels of Methionine on Immune Function and IFN-γ Gene Expression in Broilers Chickens

H. R. Seyedabadi[1*]- K. Nasiri[2]- Z. Roudbari[3] – S. A. Hosseini[4] – A. Akbari[5]

Submitted: 10-07-2019
Accepted: 24-11-2019

Introduction: Essential amino acids comprise 10 to 13% of the poultry diet. Methionine is the first limiting amino acid that plays important roles in protein metabolism and immune functions in chickens. Previous studies have shown that the appropriate level of methionine in the diet increases the growth and it is essential for enhancing the immune response. Methionine is also requirement to increase the function of the T cells produced from the thymus. Methionine has beneficial effects on the immune system and improves both humoral and cellular immune responses. Interferon-gamma (IFN-γ) is one of the components of group-specific immune cytokines and an important activator of macrophages. IFN-γ is known as cytokine which it is critical for innate and adaptive immunity against viral, some bacterial and protozoa infections. The aim of present study was to investigate effect of different diet levels of methionine on immune system and IFNγ gene expression in broiler chickens.

Materials and Methods: This study was conducted in a completely randomized design with six experimental groups with 4 replicates and 20 observations in each replicate. The difference was in the levels of dietary methionine in the growth period, which included experimental groups 0.29, 0.36, 0.43, 0.51, 0.57 and 0.64%. The antibody produced against the sheep's red blood cell, white blood cell differential counts and the volume percentages of red blood cells were determined. In order to determine the IFNγ gene expression, the whole RNA was extracted from the liver tissue of different treatment chickens. Then, cDNA was synthesized and the expression of the IFNγ gene was evaluated using Real Time PCR. In this study, design of primers (GAPDH and IFNγ) was performed using primer premier software version 5 to evaluate IFNγ gene expression in broiler chickens. Real-time PCR was performed using SYBER Green qPCR Master Mixes (Thermo) in Lightcyclear 96 (Roche). Melting curve of IFNγ and GAPDH gene productions were drawn using Real Time PCR for broiler chickens. The relative gene expression was quantified by the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. The results were analyzed by GLM method of SAS software. Tukey post hoc test was used to compare the means of the experimental groups at the significant level of 0.05.

Results and Discussion: The results showed that response to sheep's red blood cell, immunoglobulin G, immunoglobulin M, white blood cells, heterophile, lymphocyte and heterophile to lymphocyte ratio were not affected by different levels of methionine, but the number of red blood cells was affected by different levels of methionine, so that the highest number of red blood cells associated to methionine level was 0.29% and the lowest value was 0.57%($p \leq 0.05$). The result of the absorption measurement of the extracted RNA samples at a wavelength of 280/260 was in a range of 1.8 to 1.9 mm, indicating the desired quality of extracted RNA. The result of melting curve of Real Time PCR and PCR products on agarose gel showed that the IFNγ and GAPDH genes were amplified in the liver tissue. The observation of band at 259 bp for the IFNγ and at 264 bp for the GAPDH gene for all samples indicates the correctness of the test and the amplification of the desired fragments. The expression results showed that there was a

1- Assistance Professor of Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2-Assistance Professor of Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3- Assistance Professor of Department Animal Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
4- Professor of Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
5- Graduated Student of Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
(*- Corresponding Author Email: hseyedabady@gmail.com)
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.81829

significant increase in IFNγ gene expression with increasing methionine levels from 0.29% to 0.43% and higher levels ($p \leq 0.05$). However, there was no significant difference between the levels of methionine 0.43 to 0.64%. Regarding the fact that the present study was carried out under normal conditions without disease challenges, etc., different levels of methionine not effect on the immune system. IFN-γ gene is a type of cytokine. Cytokines do not exist as precursor molecules, and their production begins with transcription of the genes. This transcription activity is usually temporary and mRNA coding for cytokines is unstable and if the immune system is stimulated by the pathogen, Innate immune is the first hostile defense way. After detecting pathogens, host cell receptors such as Toll-like and nucleotide oligomers that include receptors are able to transmit a variety of signals, and subsequently cytokine gene expression networks begin to function until the innate immune responses begin.

Conclusion: The results showed that IFN-γ gene expression was significantly increased by increasing methionine levels from 0.29% upwards. Perhaps one of the reasons for increased IFN2 gene expression in this study is the application of appropriate methionine levels in experimental treatments and the benefits of appropriate methionine levels in the diet to enhance immune function in the bird, although the present study was conducted under normal growing conditions and without the challenge of pathogens.

Keywords: Broiler chickens, Gene expression, Immune system, IFNγ gene.